

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620130154139

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

博士学位论文

细胞坏死抑制细胞凋亡的分子机制研究

Investigation of the molecular mechanism used by the

necroptosis pathway to suppress apoptosis

杨章华

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2016 年 05 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 05 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘要

细胞凋亡和细胞坏死是最主要的两种细胞程序性死亡方式,在个体生长发育、内环境稳态维持以及众多生理和病理过程中发挥着重要作用。由于细胞坏死和细胞凋亡具有截然不同的特征,它们会造成截然不同的生物学结果,因此,细胞死亡方式的选择受到极其严密的调控。这两种死亡方式不是相互孤立的,而是存在着相互联系、相互竞争的关系,在特定的条件下还可以相互转化。大量遗传学的证据表明,细胞凋亡可以抑制细胞坏死,这对胚胎的正常发育至关重要;然而人们对于细胞坏死如何抑制细胞凋亡却一无所知。

肿瘤坏死因子(TNF)可以分别通过死亡诱导信号复合体(DISC)或坏死小体(Necrosome)诱导细胞凋亡或细胞坏死。分子层面上,DISC和Necrosome之间的相互转化决定了细胞在TNF刺激下是走向凋亡还是坏死。已有研究表明,细胞凋亡的核心分子caspase-8可以通过剪切作用抑制坏死小体诱导的细胞坏死。我们在L929细胞中研究发现,在TNF信号通路中,坏死小体的核心成分受体相互作用蛋白1(RIP1),RIP3和混合系蛋白激酶样结构域蛋白(MLKL)分别在上游和下游以不同的机制抑制细胞凋亡。RIP1可以阻滞TRADD-FADD-caspase-8复合体结合到TNF受体1(TNFR1)上,从而抑制快速的细胞凋亡的发生。90kDa核糖体S6蛋白激酶1(RSK1)是我们新鉴定的坏死小体的组分,它可以通过磷酸化caspase-8的T265位氨基酸,抑制其活性,从而抑制细胞凋亡。TNF诱导RSK1募集到坏死小体上需要同时依赖于RIP3和MLKL。与RIP3和MLKL不同的是,RSK1并不负责转导细胞坏死的信号,而是通过抑制caspase-8的活性,减少RIP1的剪切,从而保证细胞坏死的进程。

我们的研究表明,坏死小体具有双重功能:一是转导细胞坏死信号使细胞走向坏死;二是抑制caspase-8的活化从而保障细胞坏死的进程。本论文的研究阐明了细胞坏死抑制细胞凋亡的分子机制,为临床上开发细胞死亡相关疾病的治疗策略提供理论依据。

**关键词:** 细胞凋亡;细胞坏死;坏死小体;受体相互作用蛋白3;90kDa核糖体S6蛋白激酶1

## Abstract

Apoptosis and necroptosis are morphologically distinct programmed cell death processes and both play essential roles in development, homeostasis and many physiological and pathological conditions. The apoptosis and necroptosis pathways are intrinsically interconnected, able to suppress each other and also switch into each other. While there has been significant progress in our understanding of suppression of necroptosis by apoptosis pathway in the past few years, to date little is known about the mechanisms used by the necroptosis pathway to block apoptosis.

Tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis and necroptosis are mediated by death-inducing signaling complex (DISC) and necrosome, respectively. The inter-conversion of DISC and necrosome determines whether apoptosis switches into necroptosis or vice versa. It is known that caspase-8 has suppressive effect on necrosome-dependent necroptosis. Here we show that the key components of necrosome, receptor-interacting protein 1 (RIP1), RIP3 and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) sequentially suppress apoptosis by distinct mechanisms in L929 cells. RIP1 limits the recruitment of TRADD-FADD-Caspase8 complex to TNFR1 to suppress the quick induction of TRADD-dependent apoptosis. The 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK1) is a newly identified constituent of necrosome and it inhibits caspase-8 activity by phosphorylating it on T265. TNF-induced recruitment of RSK1 to necrosome requires RIP3 and MLKL. Unlike RIP3 and MLKL, RSK1 does not mediate the signaling transduction of necroptosis, but functions to prevent RIP1 from cleaving by caspase-8 and ensure necroptosis signaling. These findings suggest that necrosome exhibits a dual role: it renders cells to undergo necroptosis and it inhibits caspase-8 activation to ensure necroptosis induction.

In this report, we uncover the molecular mechanism that how necroptotic pathway suppress apoptosis which provides theoretical basis for the development of therapeutic strategies aimed at cell death related diseases.

**Key words:** Apoptosis, necroptosis, necrosome, RIP3, RSK1

# 目录

摘要 .....	I
ABSTRACT .....	II
第一章 前言 .....	1
1.1 细胞凋亡和细胞坏死概述 .....	1
1.2 细胞凋亡和细胞坏死的机制 .....	2
1.2.1 Caspase——细胞凋亡的-executioner .....	2
1.2.1.1 Caspase 简介 .....	2
1.2.1.2 Caspase 的活化机制 .....	4
1.2.1.3 Caspase 的活性调控机制 .....	5
1.2.2 细胞凋亡的外在途径 .....	6
1.2.3 细胞凋亡的内在途径 .....	7
1.2.4 细胞坏死的机制 .....	8
1.2.4.1 RIP1 是细胞坏死过程中的关键激酶 .....	8
1.2.4.2 RIP3 是细胞坏死的分子开关 .....	9
1.2.4.3 MLKL 介导细胞坏死 .....	9
1.2.4.4 细胞坏死的生理学意义 .....	11
1.3 细胞凋亡和细胞坏死的相互联系 .....	13
1.3.1 细胞凋亡可以抑制细胞坏死 .....	15
1.3.2 细胞坏死可以抑制细胞凋亡 .....	16
1.4 90kDa 核糖体 S6 蛋白激酶 (90kDa ribosomal S6 kinase, RSK) .....	17
1.4.1 RSK 家族简介 .....	17
1.4.2 RSK 家族的结构特征 .....	18
1.4.3 RSK 家族的激活方式 .....	18
1.4.4 RSK 的表达和细胞分布 .....	20
1.4.5 RSK 家族的功能 .....	21
1.4.5.1 RSK 对转录的调控 .....	21
1.4.5.2 RSK 对蛋白翻译的调控 .....	22

1.4.5.3 RSK 对细胞周期和细胞增殖的调控.....	23
1.4.5.4 RSK 对细胞存活的调控.....	24
<b>1.5 立题背景.....</b>	<b>25</b>
<b>第二章 材料和方法.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 实验材料.....</b>	<b>27</b>
2.1.1 细胞系.....	27
2.1.2 药品和试剂.....	27
<b>2.2 实验主要仪器.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 分子克隆相关实验和方法.....</b>	<b>29</b>
2.3.1 质粒载体.....	29
2.3.1.1 pBOBI 载体.....	29
2.3.1.2 pLV 载体.....	29
2.3.1.3 gRNA 载体.....	29
2.3.2 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	29
2.3.3 DNA 转化感受态细胞.....	30
2.3.4 质粒 DNA 的中量提取（碱变性裂解法）.....	30
2.3.5 DNA 的限制性酶切.....	31
2.3.6 PCR 反应.....	31
2.3.7 DNA 片段的回收和纯化.....	32
2.3.7.1 琼脂糖电泳分离 DNA.....	32
2.3.7.2 DNA 的回收纯化.....	32
2.3.8 质粒构建.....	33
<b>2.4 蛋白质相关实验和方法.....</b>	<b>33</b>
2.4.1 免疫共沉淀.....	33
2.4.2 免疫印迹.....	34
2.4.3 Caspase 活性测定.....	35
2.4.4 蛋白去磷酸化实验.....	36
2.4.5 体外激酶磷酸化反应.....	36
2.4.6 蛋白质质谱技术.....	36

2.4.6.1 肽段样品制备.....	37
2.4.6.2 酶解肽段的 C18 反相色谱柱脱盐 .....	37
2.4.6.3 IMAC 吸附柱制备及磷酸化肽段富集方法 .....	38
<b>2.5 细胞相关实验和方法.....</b>	<b>40</b>
2.5.1 细胞培养和传代 .....	40
2.5.2 细胞转染 .....	40
2.5.2.1 磷酸钙转染法.....	40
2.5.2.2 电穿孔转染.....	41
2.5.3 慢病毒的包装与感染 .....	41
2.5.3.1 慢病毒的包装.....	41
2.5.3.2 细胞的病毒感染.....	41
2.5.4 利用 Cas9 构建基因敲除 (Knock out) 细胞系.....	42
2.5.5 细胞药物刺激 .....	42
2.5.6 细胞存活率测定 .....	42
2.5.6.1 细胞活力检测 (Cell Viability Assays) .....	42
2.5.6.2 TUNEL .....	43
2.5.7 透射电镜 (Transmission Electron Microscopy, TEM) .....	44
2.5.8 冰冻切片免疫荧光 .....	44
<b>第三章 结果与讨论.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 RIP1, RIP3 和 MLKL 可以抑制 TNF 诱导的细胞凋亡 .....</b>	<b>45</b>
3.1.1 在 L929 细胞中敲除 RIP1, RIP3 或 MLKL 可以将 TNF 诱导的细胞坏死转向细胞凋亡 .....	45
3.1.2 RIP1 KO, RIP3 KO 和 MLKL KO L929 细胞中的凋亡是经典的外源性凋亡 .....	48
3.1.3 RIP1 KO, RIP3 KO 和 MLKL KO L929 细胞中的凋亡都依赖于 TRADD 和 FADD.....	50
<b>3.2 RIP1 通过竞争 DD 结构域的结合抑制 TRADD 依赖的细胞凋亡.....</b>	<b>52</b>
3.2.1 RIP1 KO L929 细胞对凋亡的敏感性不是由于 NF- $\kappa$ B 的活化缺陷所导致 .....	52



3.2.2 RIP1 抑制 TRADD-FADD-caspase-8 募集到 TNFR1 上 .....	53
3.2.3 RIP1 在 complex II 中抑制 TRADD 结合 FADD .....	55
3.3 RIP3 的激酶结构域和 RHIM 结构域对其抑制细胞凋亡都是必需的 .....	56
3.4 RSK1 以坏死小体依赖的方式磷酸化 caspase-8 并抑制其活性 .....	58
3.4.1 Caspase-8 的 T265 位氨基酸会发生磷酸化 .....	58
3.4.2 Caspase-8 的 T265 位磷酸化抑制其活性使其无法诱导凋亡 .....	59
3.4.3 Caspase-8 的 T265 位磷酸化破坏其抑制坏死的功能 .....	62
3.4.4 Caspase-8 在 TNF 刺激下发生坏死小体依赖的 T265 位磷酸化 .....	62
3.4.5 RSK1 在 TNF 刺激下磷酸化 caspase-8 的 T265 位氨基酸 .....	64
3.5 RSK1 募集到坏死小体是其抑制 caspase-8 活性所必需的 .....	65
3.5.1 RSK1 通过抑制 caspase-8 活性保障细胞坏死信号 .....	65
3.5.2 RSK1 在 TNF 刺激下可以募集到坏死小体上 .....	66
3.5.3 RSK1 的氨基端激酶结构域负责抑制 caspase-8 的活化 .....	68
3.5.4 TNF 诱导的 ERK 活性在 RSK1 介导的 caspase-8 活性的抑制过程中并没有作用 .....	69
3.6 RIP3, MLKL 和 RSK1 募集到坏死小体的先后次序 .....	71
3.7 在急性胰腺炎模型中, RIP3 敲除的小鼠表现出更多的凋亡 .....	72
3.8 讨论 .....	73
附录 1 图表索引 .....	77
附录 2 缩略语及中英文对照 .....	79
参考文献 .....	82
致谢 .....	95

## Table of Contents

<b>Abstract ( in Chinese ) .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract ( in English ) .....</b>	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction of apoptosis and necroptosis .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Mechanism of apoptosis and necroptosis .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1 Caspase——executioner of apoptosis .....</b>	<b>2</b>
1.2.1.1 Introduction of caspase .....	2
1.2.1.2 Activation mechanism of caspase .....	4
1.2.1.3 Regulation of caspase activation.....	5
<b>1.2.2 The extrinsic pathway of apoptosis.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.3 The intrinsic pathway of apoptosis .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.4 Mechanism of necroptosis.....</b>	<b>8</b>
1.2.4.1 RIP1 is the essential kinase of necroptosis .....	8
1.2.4.2 RIP3 is the molecular switch of necroptosis.....	9
1.2.4.3 MLKL executes necroptosis .....	9
1.2.4.4 Physiological functions of necroptosis .....	11
<b>1.3 Interplay between apoptosis and necroptosis.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Apoptosis is able to suppress necroptosis .....	15
1.3.2 Necroptosis is able to suppress necroptosis .....	16
<b>1.4 RSK (90kDa ribosomal S6 kinase) .....</b>	<b>17</b>
1.4.1 Introduction of RSK family .....	17
1.4.2 Structure features of RSKs .....	18
1.4.3 Activation mechanism of RSKs .....	18
1.4.4 Expression pattern and subcellular localization of RSKs.....	20
1.4.5 Biological functions of RSKs .....	21
1.4.5.1 Transcription regulation by RSKs.....	21
1.4.5.2 Translation regulation by RSKs .....	22
1.4.5.3 Regulation of cell cycle and cell proliferation by RSKs.....	23

1.4.5.4 Regulation of cell survival by RSKs.....	24
<b>1.5 Background of this thesis .....</b>	<b>25</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Materials .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Cell lines .....	27
2.1.2 Drugs and reagents.....	27
<b>2.2 Experimental equipments .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 Experiments and methods for molecular cloning .....</b>	<b>29</b>
2.3.1 Plasmids vectors .....	29
2.3.1.1 pBOBI vector.....	29
2.3.1.2 pLV vector.....	29
2.3.1.3 gRNA vector .....	29
2.3.2 Preparation of competent cells.....	29
2.3.3 Transformation of DNA into competent cells.....	30
2.3.4 Midi-Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis .....	30
2.3.5 Enzymatic manipulation of DNA.....	31
2.3.6 PCR reaction.....	31
2.3.7 Recovery and purification of DNA .....	32
2.3.7.1 Agarose gel electrophoresis .....	32
2.3.7.2 Recovery of DNA from agarose gel.....	32
2.3.8 Construction of plasmid vector .....	33
<b>2.4 Protein-related experiments and methods.....</b>	<b>33</b>
2.4.1 Co-immunoprecipitation.....	33
2.4.2 Western blot.....	34
2.4.3 Measurement of caspase activity.....	35
2.4.4 Protein phosphatase assay .....	36
2.4.5 In vitro kinase assay .....	36
2.4.6 Mass spectrometry technology .....	36
2.4.6.1 Preparation of peptides .....	37

2.4.6.2 Desalt of peptides by C18 reversed phase chromatography .....	37
2.4.6.3 Enrichment of phospho-peptides by IMAC .....	38
<b>2.5 Cell-related experiments and methods.....</b>	<b>40</b>
2.5.1 Cell culture and passage .....	40
2.5.2 Cell transfection.....	40
2.5.2.1 Calcium phosphate transfection.....	40
2.5.2.2 Electroporation.....	41
2.5.3 Lentivirus packaging and infection .....	41
2.5.3.1 Lentivirus packaging.....	41
2.5.3.2 Lentivirus infection.....	41
2.5.4 Construction of gene knock out cell lines using Cas9 .....	42
2.5.5 Stimulation of cells .....	42
2.5.6 Measurement of cell survival rate.....	42
2.5.6.1 Cell viability assays .....	42
2.5.6.2 TUNEL .....	43
2.5.7 TEM (Transmission Electron Microscopy) .....	44
2.5.8 Immunofluorescence .....	44
<b>Chapter 3 Results and Discussion .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 RIP1, RIP3 and MLKL function to suppress TNF-induced apoptosis .....</b>	<b>45</b>
3.1.1 Deletion of RIP1, RIP3 or MLKL switches TNF-induced necroptosis to apoptosis.....	45
3.1.2 Apoptosis in RIP1 KO, RIP3 KO and MLKL KO L929 cells are mediated by typical extrinsic pathway .....	48
3.1.3 Apoptosis in RIP1 KO, RIP3 KO and MLKL KO L929 cells are all dependent on TRADD and FADD.....	50
<b>3.2 RIP1 competes with TRADD for death domain (DD) binding to inhibit the induction of TRADD-dependent apoptosis.....</b>	<b>52</b>
3.2.1 The much more sensitive to TNF-induced apoptosis in RIP1 KO L929 cells is not due to the blockage of NF- $\kappa$ B.....	52

3.2.2 RIP1 inhibits the recruitment of TRADD-FADD-caspase-8 to TNFR1 ...	53
3.2.3 RIP1 prevents TRADD from binding to FADD in complex II .....	55
3.3 The kinase and RHIM domains of RIP3 are required to suppress apoptosis	56
3.4 Necrosome-dependent phosphorylation of caspase-8 on T265 by RSK1	
inactivates caspase-8 .....	58
3.4.1 Phosphorylation of caspase-8 on T265 .....	58
3.4.2 Phosphorylation of caspase-8 on T265 inactivates caspase-8 and blocks its	
ability to induce apoptosis .....	59
3.4.3 Phosphorylation of caspase-8 on T265 disrupts its ability to suppress	
necroptosis.....	62
3.4.4 Necrosome-dependent phosphorylation of caspase-8 .....	62
3.4.5 Phosphorylation and inactivation of caspase-8 on T265 by RSK1 .....	64
3.5 Recruitment of RSK1 to necrosome is essential for inhibition of caspase-8	
activation.....	65
3.5.1 RSK1 ensures necroptosis by inhibiting caspase-8 activation.....	65
3.5.2 RSK1 is a component of TNF-induced necrosome.....	66
3.5.3 The N-terminal kinase activity of RSK1 is responsible for the suppression	
of caspase-8 activation.....	68
3.5.4 TNF-induced ERK activation did not play a role in RSK1-mediated	
caspase-8 suppression.....	69
3.6 The sequence of TNF-induced recruitment of RIP3, MLKL and RSK1 to	
necrosome .....	71
3.7 RIP3 KO mice show more apoptosis induction on cerulean-induced acute	
pancreatitis .....	72
3.8 Discussion.....	73
Appendix 1 Index of figures and tables.....	77
Appendix 2 Abbreviations.....	79
Reference .....	82
Acknowledgemets.....	95

## 第一章 前言

### 1.1 细胞凋亡和细胞坏死概述

凋亡还是坏死，这是细胞死亡时面临的一个问题。

细胞死亡是一种普遍存在的、非常重要的基本生物学现象，它在个体生长发育、内环境稳态维持以及众多生理和病理过程中都发挥着重要作用。根据细胞死亡时形态学上的特征差异，可以将细胞死亡分为细胞凋亡（Apoptosis）和细胞坏死（Necrosis）两大类<sup>[1]</sup>。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡（Programmed Cell Death），发生在机体生长和发育的各个阶段。细胞凋亡在维持组织的机能和形态、胚胎的发育及形态建成、机体的防御反应、细胞衰老、肿瘤的发生发展等生命过程中扮演重要角色。凋亡细胞的特征主要包括：（1）细胞伪足收缩，细胞变圆，体积缩小；（2）染色质固缩、断裂；（3）核酸内切酶活化，导致染色质 DNA 在核小体连接部位断裂，形成约 200bp 整倍数的核酸片段，凝胶电泳图谱呈梯状，即核酸片段化；（4）细胞膜以“出芽”方式形成包裹着细胞质、染色质和细胞器的小泡，即凋亡小体；（5）凋亡细胞的膜结构保持完整，形成的凋亡小体被吞噬细胞清除，没有细胞内容物释放，一般不会引起机体的炎症反应<sup>[2]</sup>。

细胞坏死在早期的研究中被认为是一种由化学因素（如强酸、强碱、有毒物质）、物理因素（如高温、辐射）或生物因素（如缺氧、病原体感染）等环境因素引起的细胞死亡现象，是一种被动的、不受机体调控的死亡方式。但是，随着研究的深入，越来越多的证据表明，细胞坏死也是一个受到一系列严密调控的过程；它和细胞凋亡一样，在胚胎发育、免疫反应及多种生理病理过程中扮演重要角色。因此，人们将这种受到调控的坏死称为程序性细胞坏死（Programmed Necrosis，或 Necroptosis）<sup>[3]</sup>。为避免造成歧义和叙述方便，如无特殊说明，本文之后所述细胞坏死均指程序性细胞坏死。

细胞坏死有明显区别于细胞凋亡的一系列特征：（1）细胞质透明化，线粒体、溶酶体、内质网等细胞器肿胀破裂；（2）核膜膨大破裂，染色质固缩或断裂；（3）细胞肿胀，体积增大，最后细胞膜破裂；（4）细胞内容物释放，引起周围组织炎症反应。图 1.1 中显示的是细胞凋亡和细胞坏死的电镜照片。

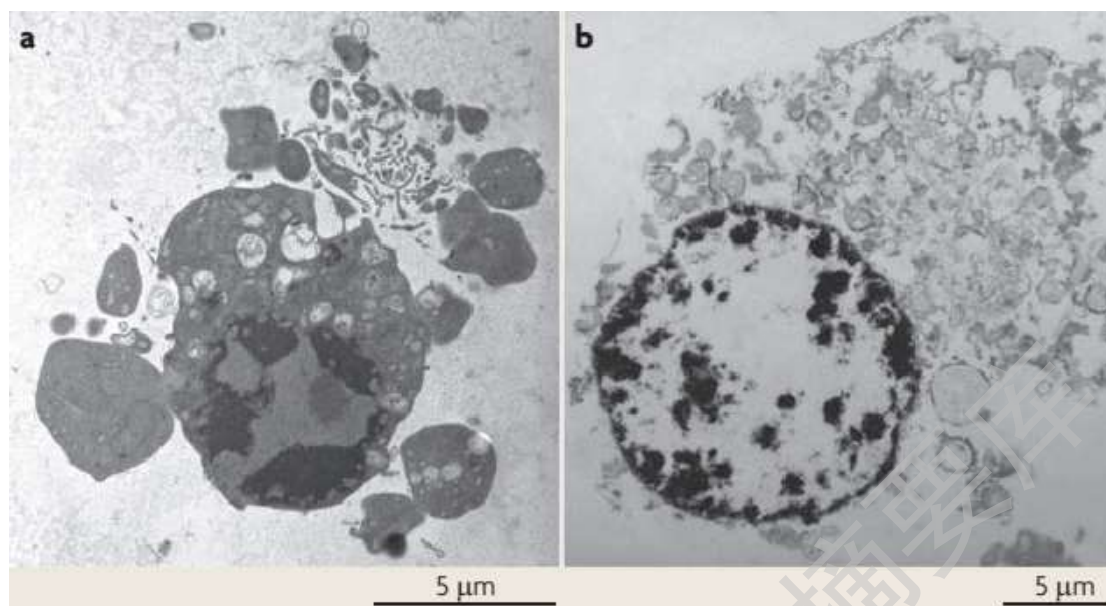


图 1.1 凋亡细胞 (a) 和坏死细胞 (b) 形态学上的差异<sup>[3]</sup>

Fig. 1.1 The different morphology between apoptotic (a) and necrotic (b) cells

## 1.2 细胞凋亡和细胞坏死的机制

### 1.2.1 Caspase——细胞凋亡的执行者

我们对细胞凋亡分子机制的认识是建立在对秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 发育机制的研究上<sup>[4]</sup>。线虫在发育过程中会产生 1090 个体细胞, 其中 131 个体细胞会在发育的过程中程序性地走向凋亡。Horvitz 及其同事研究发现, 在线虫发育过程中凋亡的 131 个细胞受到少量基因的调控, 他们把这些基因命名为细胞凋亡缺陷 (Cell death defective, Ced); 之后研究者克隆出了其中的一个基因 Ced3, 发现它是一个含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Cysteiny protease cleaving at the carboxyl side of an aspartic acid, Caspase), 并且这个基因从线虫到哺乳动物都是保守的<sup>[5]</sup>。在这之后, 大量 Ced-3 的同源基因及这些蛋白水解酶的底物被发现, 使细胞凋亡的研究成为近二十几年最热门的领域之一。

#### 1.2.1.1 Caspase 简介

Caspase 是一类高度保守的存在于细胞质中的水解酶。Caspase 家族成员的一个重要共同特征就是它们的蛋白酶活性位点都含有半胱氨酸, 并且它们都特异性

地剪切天冬氨酸残基后面的肽键。这个特征使 caspase 可以高度选择性地切割某些蛋白，使该蛋白活化或失活，从而在胚胎发育过程中扮演重要角色，并且调控多种生理过程，如细胞凋亡、细胞分化、细胞增殖、炎症反应等<sup>[6]</sup>。Caspase 家族的首个成员是在 1989 年被鉴定的，它是一个能够剪切 IL-1 $\beta$  前体的蛋白酶，随后被克隆并命名为 caspase-1<sup>[7,8]</sup>。Horvitz 等人在研究线虫细胞程序性死亡的过程中鉴定并克隆了执行细胞程序性死亡的关键基因 Ced-3，并证实 Ced-3 是一种蛋白水解酶<sup>[5]</sup>。这项研究极大地促进了其它物种尤其是哺乳类动物中细胞程序性死亡的研究，大量的 Ced-3 同源基因相继被发现，并被命名为 caspase。截至目前，在人类细胞中总共发现了 11 个 caspase。根据这些 caspase 不同的结构和功能，可将其分为两大类(如图 1.2): (1) 促凋亡的 caspases (Proapoptotic Caspases), 包括 caspase-2,-3,-6,-7,-8,-9,和-10; (2) 促炎性的 caspases (Proinflammatory Caspases), 包括 caspase-1,-4,和-5。Caspase-14 比较特殊，它只在皮肤的角质细胞中表达，影响角质细胞的分化。促凋亡的 caspases 以级联放大的方式剪切大量的细胞蛋白，最终导致细胞凋亡的发生，根据级联反应的上下游关系，又可将促凋亡的 caspases 细分为两类：起始者 (initiators) 和执行者 (effectors) <sup>[9]</sup>。

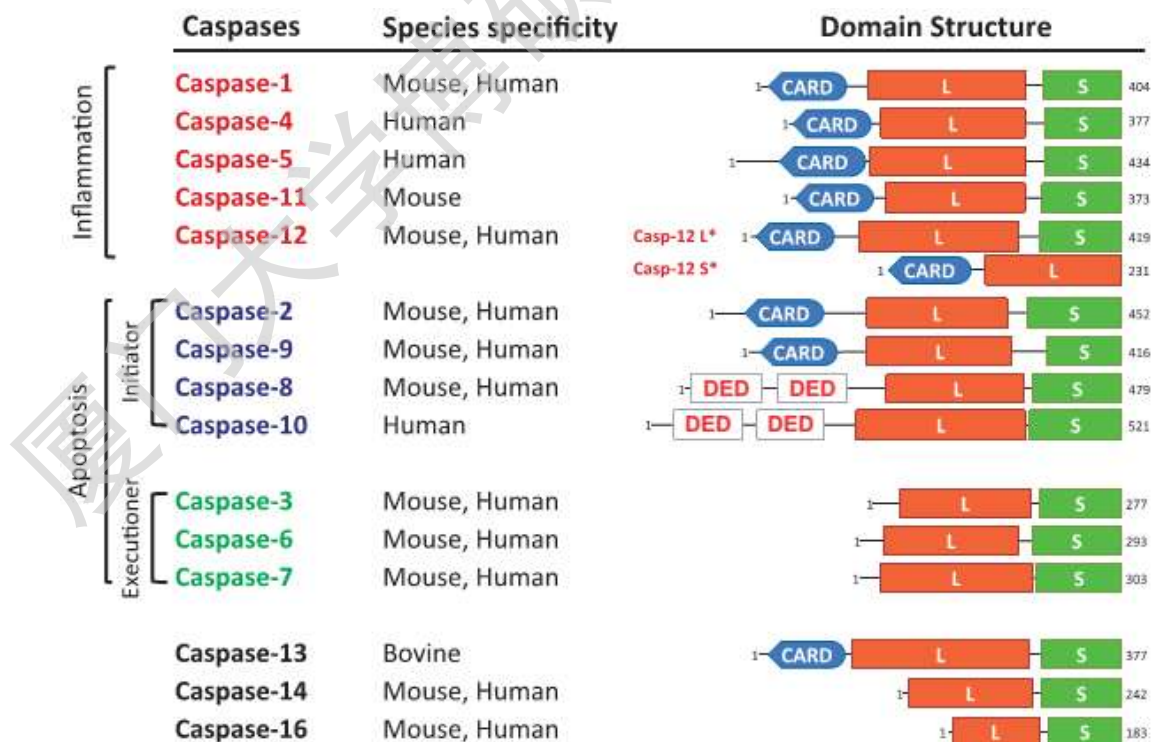


图 1.2 Caspases 结构特征及其分类<sup>[9]</sup>

Fig.1.2 Domain structure and functional classification of mammalian caspases



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.